

# $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質の肝取り込み機構及び 新規抗炎症作用としての CD163 誘導機構の解明

生命薬科学専攻 医療薬学講座 薬物動態制御学分野 小森 久和

$\alpha_1$ -Acid glycoprotein (AGP) は疎水性低分子輸送に関与するリポカリンファミリーに属し、血清中においてプロゲステロンやリゾリン脂質等の内因性リガンドに加え、塩基性薬物の主要輸送担体として機能している。また、急性期タンパク質の一つとしても知られており、急性期（炎症、火傷、感染症、腫瘍等）や妊娠時には、その血清中濃度が正常時の 2~5 倍にまで上昇する。これまでに AGP は抗炎症作用や免疫調節作用等の多様な生理作用を有することが報告されているものの、その詳細な機序は明らかにされていなかった。特に、AGP の体内動態については不明な点が多く、AGP の生理作用を解明する上での障壁となっていた。そこで、AGP のマウスにおける体内動態評価を行い、主要移行臓器である肝臓への取り込み機構の解析を行った。また、溶血時に発現誘導される AGP が、酸化傷害を惹起する遊離ヘモグロビン (Hb) の細胞内取り込みレセプターである CD163 の発現に及ぼす影響を検討するとともに、発現調節機序の解明を試みた。以下に本研究で得られた知見を要約する。

## 1. AGP の動態特性と肝取り込み機構の解明

マウスにおける  $^{111}\text{In}$ -AGP の血漿中濃度推移及び主要分布臓器である肝臓への蓄積は 100 倍量の asialoAGP の同時投与によってもほとんど影響を受けなかったことから、従来から AGP の受容体と考えられてきた asialoglycoprotein receptor とは異なる経路によって肝臓へ取り込まれることが示唆された。また、糖鎖欠損 AGP (rAGP) の体内動態を評価したところ、より高い肝臓への移行性が観察され、その肝臓分布は過剰量の非標識 AGP の同時投与により有意に減少した。このことから、 $^{111}\text{In}$ -AGP と  $^{111}\text{In}$ -rAGP は同じ経路で肝臓へ取り込まれることが示され、取り込み過程において AGP のペプチド部分が寄与することが示唆された。また、 $^{111}\text{In}$ -AGP 及び  $^{111}\text{In}$ -rAGP のいずれも 95%以上が肝実質細胞へ取り込まれたことから、マウス初代肝実質細胞及びヒト肝癌細胞株 HepG2 より調製した粗膜画分を二次元電気泳動で分離し、 $^{125}\text{I}$ -AGP による ligand blotting を行った。その結果、分子量 16 kDa、等電点 7.5 付近にバンドが得られ、MALDI-TOF/MS 解析の結果から、上述した AGP のペプチド部分と相互作用する分子として hemoglobin  $\beta$ -chain (HBB) が同定された。続いて、AGP の細胞内取り込みについて評価したところ、FITC-AGP は濃度及び時間依存的にエンドサイトーシスによって HepG2 細胞内へ取り込まれることが、その温度依存性から見出された。さらに、FITC-AGP の取り込みは methyl- $\beta$ -cyclodextrin 及び filipin 前処理で有意に阻害され、chlorpromazine 前処理では阻害されなかったことから、FITC-AGP は clathrin 経路ではなく、caveolae/lipid rafts を介した経路でエンドサイトーシスされるものと推察された。加えて、HBB をノックダウンした HepG2 細胞では、FITC-AGP の取り込みは約 40%阻害された。以上の結果より、AGP の肝実質細胞への取り込み機構には、HBB との相互作用を介した caveolae/lipid rafts 介在性エンドサイトーシスが関与していることが示唆された。

## 2. AGP による CD163 誘導作用を介した新規抗炎症機序の解明

マクロファージ様に分化したヒト単球系細胞株 dTHP-1 において、代表的急性期タンパク質 (AGP, AAT, Hp, CRP) の中でも、AGP のみが CD163 の発現を濃度依存的に誘導し、AGP の急性期濃度付近では、その効果がほぼプラトーに達した。THP-1 及びヒト末梢血単核球においても同様の結果が得られ、AGP を投与したマウスの白血球においても CD163 の有意な発現上昇が観察された。次に、FITC-Hb を用いて dTHP-1 への細胞内取り込みを評価したところ、AGP 処理によって FITC-Hb の取り込みは増大し、Hb の取り込みに伴う HO-1 の発現誘導が確認された。また、phenylhydrazine 誘発溶血モデルマウスでの検討において、AGP 投与群の肝臓では CD163 の発現が有意に上昇し、HO-1 の発現上昇も観察された。このことから、AGP 投与による遊離 Hb の細胞内取り込み亢進が強く示唆された。さらに、AGP 投与群においては、非投与群に比べて血漿中の脂質過酸化及びヒドロペルオキシド量が有意に減少した。続いて、dTHP-1 を用いた AGP による CD163 の誘導機序の検討において、CD163 の誘導因子として知られている IL-6 及び IL-10 の発現量が AGP 処理により著しく上昇した。また、既報により AGP は血清中の可溶性 CD14 と結合することから、CD14 中和抗体共存下で dTHP-1 を AGP 処理したところ、IL-6 及び IL-10 の誘導は有意に抑制され、それに伴い CD163 の誘導も抑制された。また、TLR4 中和抗体を用いた検討においても同様の結果が得られた。さらに CD14/TLR4/MD2 を発現させた HEK293 において、AGP は TLR4 を活性化し、それには TLR4 下流の NF- $\kappa$ B 及び MAPK (JNK, p38) の経路が関与していた。AGP による TLR4 の活性化は、さらなる炎症を引き起こす可能性が考えられるため、LPS とサイトカイン産生能について比較したところ、LPS は TNF- $\alpha$  及び IL-6 を濃度依存的に誘導したのに対し、IL-10 では濃度依存的な変化は観察されなかった。一方、AGP は TNF- $\alpha$ 、IL-6 及び IL-10 を濃度依存的に誘導し、急性期濃度付近ではほぼプラトーに達した。その際、AGP による TNF- $\alpha$  及び IL-6 の産生は、LPS と比べて非常に低かった。したがって、AGP は過度の炎症を引き起こすことなく、CD163 の発現を誘導する可能性が示された。以上の結果より、AGP は CD14/TLR4 経路を介して IL-6 及び IL-10 の産生を亢進することで CD163 の発現を誘導することを明らかにするとともに、AGP は溶血時の血中酸化ストレスを抑制することで生体保護に寄与することが示された。

以上、本研究では、AGP の主要移行臓器である肝臓への取り込み機構に、AGP のペプチド部分と HBB との相互作用が一部関与することを初めて明らかにした。また、AGP の溶血時における新たな生理機能として、CD163 の発現を誘導することで、循環血中からの遊離 Hb の消失を促進し、遊離 Hb に起因する酸化ストレスを抑制することを明らかにした。本研究で得られた知見は、これまで不明であった AGP の動態特性及び抗炎症機序について、AGP が作用する分子ターゲットの一端を明らかにし、AGP の生理機能を理解する上での基盤となる意義深いものであり、動脈硬化症のような溶血関連疾患への新たな治療戦略の糸口に繋がるものと考えられる。